

A2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 8 - 2 3 1 5 9 8

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 9 月 10 日

(51) Int. Cl. °

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C07K 16/24

1/16

1/18

1/22

1/26

審査請求 未請求 請求項の数 12 F D (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平 7 - 5 8 2 4 0

(22) 出願日

平成 7 年 (1995) 2 月 23 日

(71) 出願人

0 0 0 1 5 5 9 0 8

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号

(72) 発明者

國方 敏夫

岡山県岡山市神田町 2 丁目 8 番 4 9 号

(72) 発明者

谷口 睦子

岡山県岡山市平井 5 丁目 3 番 3 0 - 5 号

(72) 発明者

河野 東三

岡山県赤松郡瀬戸町沖 1 5 5 番地 - 6

(72) 発明者

栗本 雅司

岡山県岡山市学術町 2 丁目 7 番 2 5 号

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体

(57) 【要約】

【目的】 免疫担当細胞において I F N - γ の産生を誘導するポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体及びそのモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ並びにそれらの用途を提供する。

【構成】 特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体と、そのモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマと、そのハイブリドーマを生体外又は生体内で培養する工程と、その培養物又は体液からモノクローナル抗体を採取する工程を含んでなるモノクローナル抗体の製造方法と、モノクローナル抗体をポリペプチドと夾雑物質を含む混合物に接触させてモノクローナル抗体にポリペプチドを吸着させる工程と、吸着したポリペプチドをモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなるポリペプチドの精製方法と、被検試料にモノクローナル抗体を接触せしめ、免疫反応によりポリペプチドを検出するポリペプチドの検出方法を要旨とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相司的なアミノ酸配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導するポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体

【請求項2】 IgG又はIgMのクラスに属する請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 モノクローナル抗体がモノクローナル抗体H-1mAb又はH-2mAbである請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 請求項1乃至3に記載のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ。

【請求項5】 ハイブリドーマがハイブリドーマH-1又はH-2である請求項4に記載のハイブリドーマ。

【請求項6】 請求項1乃至3に記載のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを生体外又は生体内で培養する工程と、その培養物又は体液からハイブリドーマを採取する工程を含んでなるモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項7】 ハイブリドーマがハイブリドーマH-1又はH-2である請求項6に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項8】 培養物又は体液からモノクローナル抗体を塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別吸収、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び又は等電点電気泳動により採取する請求項7に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項9】 請求項1乃至3に記載のモノクローナル抗体を配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相司的なアミノ酸配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導するポリペプチドと免疫物質を含む混合液に接触せしめてモノクローナル抗体がポリペプチドを吸着せしめる工程と、吸着したポリペプチドをモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなるポリペプチドの精製方法。

【請求項10】 モノクローナル抗体が不溶生体組織に含まれている請求項9に記載のポリペプチドの精製方法。

【請求項11】 請求項1乃至8に記載のモノクローナル抗体を被検試料に接触せしめ、免疫反応により配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相司的なアミノ酸配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導するポリペプチドを検出する

ポリペプチドの検出方法。

【請求項12】 モノクローナル抗体が放射性物質、酵素及び又は蛍光物質により標識されている請求項11に記載のポリペプチドの検出方法。

【発明の概要】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は新規なモノクローナル抗体に関するものであり、詳細には、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ （以下、「IFN- γ 」と略記する。）の産生を誘導するポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体に関するものである。

【0002】

【従来技術】 IFN- γ は、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマイトジェンによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると云われている。これら生物作用ゆえに、IFN- γ はその発見当初より抗腫瘍剤としての実用化が鶴首され、現在では脱腫瘍を始めとする悪性腫瘍一般の治療剤として精力的に臨床試験が進められている。現在入手し得るIFN- γ は免疫担当細胞が産生する天然型IFN- γ と、免疫担当細胞から採取したIFN- γ をコーティングするDNAを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換え型IFN- γ に大別され、上述臨床試験においては、これらのうちのいずれかが「外来IFN- γ 」として投与されている。

【0003】 このうち、天然型IFN- γ は、通常、培養細胞化した免疫担当細胞をIFN- γ 誘導剤を含む培養培地で培養し、その培地を精製することにより製造される。この方法では、IFN- γ 誘導剤の種類、IFN- γ の産生量や精製のし易さ、さらには、製品の安全性等に多大の影響を及ぼすと云われており、通常、コンカミリンA、レンチウイルス、アメリシヤマコボウレクチン、エンドキニン、リポ多糖などのマイトジェンが適用される。しかしながら、これら物質は、いずれも分子の多様性があり、給与の精製方法によって品質が変動し易く、誘導能の異なるIFN- γ 誘導剤を所望量入手し難いという問題がある。すなわち、上述物質の多くは生体に投与すると顕著な副作用を示したり、物質に依っては毒性を示すものもあり、生体に直接投与してIFN- γ の産生を誘導するのが極めて困難であった。

【0004】 本発明者らが、哺乳類の細胞が産生するサイトカインにつき研究していたところ、マウスの肝臓中にIFN- γ の産生を誘導する物質が存在することを見出した。カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの物質を単離し、その性質・性状を調べたところ、その性質は蛋白質であり、次のような理化学的性質を有していることが判明した。

（1）分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量19,000-25,000、0.005-0.01ダ

ルトンを示す。

(2) 等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、 4.8 ± 1.0 に等電点を示す。

(3) 部分アミノ酸配列

配列表における配列番号4及び5に示す部分アミノ酸配列を有する。

(4) 生物作用

免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する。

【0005】斯かる理化学的性質を有する蛋白質は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。そこで、本発明者らが、引続き、マウス肝細胞を鋭意検索したところ、このDNAは471塩基対からなり、配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列をコードしていることが判明した。

【0006】これら知見に基づき、ヒト肝細胞を引続き検索したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するさらに別の新規物質をコードするDNAが得られた。この物質の性質はポリペプチドであり、DNAを解読したところ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を含んでなることが判明した。その後、このDNAを大腸菌に導入し、発現させたところ、培養物中にポリペプチドが好収量で産生した。以上の知見は、日本特許出願人による特願平6-16416号明細書及び特願平6-304263号明細書に開示されている。

【0007】上述のとおり、当該ポリペプチドは免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質を具備しており、汎用IFN- γ 誘導剤、さらには、抗ウイルス剤、抗癌剤、抗腐剤、免疫調節剤、血小板増殖剤などとして多種多様な用途が期待される。一般に、生理活性ポリペプチドを医薬品に配合使用しようとする、そのポリペプチドを高純度且つ効率的に精製し得る方法や、数多くの変換試料を一度にアッセイする方法の開発が不可欠となる。斯かる精製及びアッセイを可能ならしめる最良の材料はモノクローナル抗体であるが、当該ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は未だ樹立されてはいない。

【0008】

【発明により解決すべき課題】斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、斯かるポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を提供することにある。

【0009】この発明の別の目的は、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを提供することにある。

【0010】この発明のさらに別の目的は、斯かるモノクローナル抗体の製造方法を提供することにある。

【0011】この発明のさらに別の目的は、斯かるモノクローナル抗体による当該ポリペプチドの精製方法を提供することにある。

【0012】この発明のさらに別の目的は、斯かるモノ

クローナル抗体による当該ポリペプチドの検出方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記第一の課題を、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相等的なアミノ酸配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有し、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体により解決するものである。

【0014】この発明は、前記第二の課題を、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマにより解決するものである。

【0015】この発明は、前記第三の課題を、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを生体外又は生体内で培養する工程と、その培養物又は体液からモノクローナル抗体を採集する工程を含んでなるモノクローナル抗体の製造方法により解決するものである。

【0016】この発明は、前記第四の課題を、斯かるモノクローナル抗体を当該ポリペプチドと抗原物質を含む混合物に接触させてモノクローナル抗体にポリペプチドを吸着させる工程と、吸着したポリペプチドをモノクローナル抗体から分離させる工程を含んでなるポリペプチドの精製方法により解決するものである。

【0017】この発明は、前記第五の課題を、被検試料に斯かるモノクローナル抗体を接触せしめ、免疫反応により当該ポリペプチドを検出するポリペプチドの検出方法により解決するものである。

【0018】

【作用】この発明のモノクローナル抗体は、特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に反応する。

【0019】この発明のハイブリドーマは、生体内外で培養すると、斯かるモノクローナル抗体を産生する。

【0020】この発明による精製方法によるときは、斯かるモノクローナル抗体の所望量が容易に得られる。

【0021】この発明による精製方法によるときは、当該ポリペプチドと抗原物質を含む混合物から、当該ポリペプチドが抗原物質に特異的に採取される。

【0022】この発明による検出方法によるときは、被検試料中の当該ポリペプチドのみ免疫反応を呈するので、検出方法は、その免疫反応を測定することにより、被検試料中の当該ポリペプチドを定性的又は定量的に検出することとなる。

【0023】以下、実施例に基づきこの発明を説明するに、この発明でいうモノクローナル抗体とは、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相等的なアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体全般を包含するものとし、その出所・由来、クラスは問わない。配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列に相等的なアミノ酸配列とは、免疫担当

10

20

30

40

50

細胞におけるIFN- γ の産生を誘導する性質が実質的に失われない範囲で、その配列番号1のアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換したもの、配列番号1のアミノ酸配列におけるN末端及び/又はC末端にアミノ酸が1又は2個以上付加したもの及びそのN末端及び/又はC末端のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したものを包含する。

【0024】この発明のモノクローナル抗体は、斯かるポリペプチド又はその抗原性フラグメントを抗原として用いることにより得ることができる。具體的には、例えば、斯かる抗原で免疫感作しておいた哺乳動物より採取した抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳動物由来の細胞とのハイブリドーマを培養し、これよりこの発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローンを選択し、これを生体内外で培養することにより得ることができる。

【0025】抗原となり得るポリペプチドは、特願平6-304203号特許に開示したように、例えば、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相補的なアミノ酸配列をコードするDNAを導入した形質転換体を培養することにより得ることができる。それらは、通常、完全精製又は部分精製した状態で使用される。抗原性フラグメントを得るには、これを完全精製品又は部分精製品を化学的又は酵素的に分解するか、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列に基づきペプチド合成すればよい。

【0026】免疫感作は慣用の方法によればよく、例えば、上記のごとき抗原を単独又は適宜アジュバントとともに哺乳動物の静脈、皮内、皮下又は腹腔内に注射接種し、一定期間飼育する。哺乳動物に特に限定はなく、所期の抗体産生細胞が得られるかぎり、種、大きさ、雌雄は問わない。通常はマウス、ラット、ハムスターなどには適当であるが、強性増殖可能な哺乳動物由来の細胞と、融合性も若干ながら、迅速な融合が認められる。用いる哺乳動物の年齢や大きさに依るが、抗体の産生量は、通常、接種量を約5乃至50 μ g/匹とし、これを約1乃至2週間の期間を置いて2乃至5回に亘けて接種する。そして、最終接種から3乃至5日後に脾臓を摘出し、分散して抗体産生細胞としての脾細胞を得る。

【0027】次に、斯くして得られた免疫産生細胞と無限増殖可能な哺乳動物由来の細胞とを融合させて、目的のハイブリドーマを含む細胞融合産物を得る。細胞増殖可能な哺乳動物由来の細胞としては、通常、P3-N3-1-A-8-1細胞(ATCC-TIB18)、P3-X63-Ag8細胞(ATCC-TIB9)及びNS12/0-1-A-6-14細胞(ATCC-CRL1581)などのマウス脾臓由来の細胞等にはその変異が用いられる。細胞融合は、例えば、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスを始めとする融合促進剤や電気バースによる慣

用の方法が用いられ、一例を挙げると、融合促進剤を含む融合培地に抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳動物由来の細胞を約1:1乃至1:10の割合で浮遊させ、この状態のまま、約30乃至40°Cで約1乃至5分間インキュベートする。融合培地には、例えば、MEM培地、RPMI1640培地及びイスコフ改変ダルベコ培地を始めとする通常一般のものを採用するが、ウシ血清などの血清類は除いておくのが望ましい。

【0028】目的のハイブリドーマを選択するには、まず、上記のようにして得た細胞融合産物をHAT培地などの選択性培地に移し、約30乃至40°Cで約3日乃至3週間培養してハイブリドーマ以外の細胞を死滅させる。つぎに、ハイブリドーマを常法により培養し、培養物中に分泌された抗体につき、当該ポリペプチドとの反応性を試験する。試験には、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ及びバイオアッセイなどの抗体を検出するための慣用の方法が用いられ、例えば、富山朝日化学株式会社「モノクローナル抗体実験マニュアル」、1991年、講談社サイエンスフィク発行、第105乃至152頁にはそのための方法が詳しく詳述されている。当該ポリペプチドに特異的な抗体を生ずるハイブリドーマは、既述の方法などにより、直ちにクローニングされ、凍蔵化されたこの発明によるハイブリドーマを得る。

【0029】この発明のモノクローナル抗体は、斯かるハイブリドーマを生体内外で培養することにより得ることができる。培養には、哺乳動物の細胞を培養するための慣用の方法が用いられ、例えば、生体外で培養培地で培養するときには、その培養物から、一方、ヒト以外の温血動物に移植して生体内で培養するときには、その腹腔及び/又は血液からモノクローナル抗体を採取する。後述のハイブリドーマH-1及びH-2はモノクローナル抗体の生産量が多く、しかも、生体内外における培養が容易であるという特徴がある。培養物又は腹水若しくは血液からモノクローナル抗体を採取するには、抗体を精製するための装置における慣用の方法が用いられる。個々の方法としては、例えば、層析、透析、凍結、濃縮、電気分離、分別沈降、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー、管型液体クロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動が挙げられ、これらは必要に応じて組合せて適用される。精製したモノクローナル抗体は、その後、濃縮・乾固し、用途に応じて液状又は固状とする。

【0030】この発明のモノクローナル抗体は、イムノグロブリンゼリー・クロマトグラフィーによる当該オリゴペプチドの精製にきわめて有用である。斯かる精製方法は、この発明のモノクローナル抗体を当該オリゴペプチドと当該オリゴペプチド以外の夾雑物質とを混合し、これを固定した物質に接触させてモノクローナル抗体にのみポリ

ペプチドのみを吸着させる工程と、吸着したポリペプチドをモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなり、前工程は、通常、水性媒体中で行なわれる。この発明のモノクローナル抗体は、通常、ゲル状の水不溶性担体に結合した状態で用いられ、その水不溶性担体を円筒管などにカラム状に充填し、これに、例えば、形質転換体の培養液又はそれらの部分精製品を通過すると、実質的に当該ポリペプチドのみが水不溶性担体上のモノクローナル抗体に吸着する。吸着したポリペプチドは、モノクローナル抗体周囲の水素イオン濃度を変えることにより、容易に脱着させることができ、例えば、1 g Gのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合は酸性側のpH、通常、pH 2乃至3で、一方、1 g Mのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合はアルカリ側のpH、通常、pH 10乃至11で脱着・溶出させる。

【0031】この発明の精製方法によるときは、当該ポリペプチドを最小限の労力と時間で高純度に精製できる。前述のとおり、当該ポリペプチドは、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質を具備するので、得られた精製ポリペプチドは細胞培養液によりIFN- γ を製造する際の誘導剤として、さらには、IFN- γ の感受性を示す疾患、例えば、エイズや尖圭コンジロムなどのウイルス性疾患、腎臓癌、肉芽腫、菌状皮膚病、肝臓癌などの悪性腫瘍、関節リウマチやアレルギー病など、免疫反応に対する治療剤・予防剤として有用である。当該ポリペプチドがキラー細胞による細胞障害性を増強する性質を兼ね備える場合には、インターロイキン2や腫瘍壊死因子と適宜併用することにより、養子免疫療法による肺癌、腎臓癌、乳癌などの固形癌を含む悪性腫瘍の治療における治療効果や副作用の改善に著効が得られる。

【0032】この発明のモノクローナル抗体は、当該ポリペプチドの検出を必要とする諸分析にも応用可能な用途を有する。すなわち、この発明のモノクローナル抗体にラジオイムノアッセイ、エッセイイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノアッセイを適用すると、例えば、被検試料中の当該ポリペプチドを迅速且つ正確に定性又は定量分析することができ、斯かる分析において、この発明のモノクローナル抗体は、例えば、放射性的質、酵素及び、又は蛍光物質により標識して用いられる。この発明のモノクローナル抗体は当該ポリペプチドに特異的に反応し、免疫反応を誘導するので、その免疫反応をこれら標識物質を指標に測定すれば、被検試料中のごく微量の当該ポリペプチドを得度良く検出することができる。標識イムノアッセイは、バイオアッセイと比較して、一般に数多くの被検試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なく、しかも、分析の高精度であるという特徴がある。したがって、この発明による検出方法は、当該ポリペプチドを製造する際の工程管理や製品の品質管理にきわめて有用である。な

お、この発明はモノクローナル抗体の標識や標識アッセイそのものに係るものではないので詳細な説明は省くが、例えば、ピー・ティッセン著、石川栄治訳『エンザイムイムノアッセイ』、1989年、東京化学同人発行、第196乃至348頁などにはそのための方法が種々詳述されている。

【0033】以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、斯界の技術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる技術水準に鑑み、この発明がこれら実施例のみに限定されるべきでないことは言うまでもない。

【0034】

【実施例1 ハイブリドーマH-1の調製】

【0035】

【実施例1-1 形質転換体KGFHH2の作製】

0.5 ml 容反応管に25 mM塩化マグネシウムを8 μ l、10 \times PCR緩衝液を10 μ l、25 mM dNTPミックスを1 μ l、2.5単位/ μ lアンプリタックDNAポリメラーゼを1 μ l、特開平6-304203号明細書に記載された方法にしたがってフェージDNAクローンから調製した配列表における配列番号2に示す塩基配列を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドをコードするDNAを含む組換えDNAを1 ng、配列表の配列番号1におけるN-末端及びC-末端付近のアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-ATAGAATTCAAATGTACTTTGGCAAGCTTGAAATC-3'及び5'-ATAAAGCTTCTAGTCTTCGTTTGAAC-3'で表わされる塩基配列のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの適量を加え、滅菌蒸留水で100 μ lとした。常法により、この混合物を94°Cで1分間、43°Cで1分間、72°Cで1分間、この順序でインキュベートするサイクルを3回繰り返した後、さらに、94°Cで1分間、60°Cで1分間、72°Cで1分間、この順序でインキュベートするサイクルを40回繰り返してPCR反応させた。

【0036】このPCR産物とストライクスクリプトプラス（トクカ）（PCR-Script SK (+））を常法にしたがってDNAリガーゼにより連結して組換えDNAとし、これをコンバットセル法によりストライクスクリプトプラス細胞株（XLI-1 Blue MRF⁺ Kan^r）に導入して形質転換した。形質転換体を50 μ l/mlアンピシリンを含むLB/アマス培地（pH 7.2）に接種し、37°Cで18時間増殖培養した後、培養物を遠心分離して形質転換体を回収し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNAを単離した。この組換えDNAの一部を取り、ジデオキシ法により分析したところ、配列表の配列番号2に示す塩基配列における5'-末端及び3'-末端にそれぞれ EcoRI 切断部位及び HindIII 切断部位を、また、その配列番号2に併記したアミノ酸配列におけるN-末端及びC-末端のそれ

10

20

30

40

50

それ直前及び直後に対応する部位にポリペプチド合成開始のためのメチオニンコドン及びポリペプチド合成終了のためのTAGコドンを含むDNAを含んでいた。

【0037】そこで、常法にしたがって残りの組換えDNAを制限酵素Eco RI及びHind IIIで切断後、宝酒造製DNAライゲーションキット『DNAライゲーション・キット・バージョン2』を使用して、得られたEco RI-Hind III DNA断片0.1 μ gと予め同じ制限酵素で切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』10ngを16°Cで30分間反応させて連結して複製可能な組換えDNA『pKGFHH2』を得た。コンピテントセル法により、この組換えDNA pKGFHH2で大腸菌Y1090株(ATCC37197)を形質転換し、得られた形質転換体『KGFHH2』を50 μ g/mlアンピシリンを含むLBブロス培地(pH7.2)に接種し、37°Cで18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、その一部に通常のSDS-アールカリ法を適用して組換えDNA pKGFHH2を抽出した。ジデオキシ法により分析したところ、図1に示すように、組換えDNA pKGFHH2においては、配列表における配列番号2に示す塩基配列を含むKGFHH2 cDNAがTaccプロモータの下流に連結されていた。

【0038】

【実施例1-2 形質転換体KGFHH2によるポリペプチドの産生】オートクレーブによりアンピシリン50 μ g/mlを含むLBブロス培地(pH7.2)を滅菌し、37°Cに冷却後、実施例1-1で作製した形質転換体KGFHH2を接種し、振盪下、同じ温度で18時間 30 種培養した。20l容シャーフレーマに新鮮な同一培地を18lとり、同様に滅菌し、37°Cに冷却後、上記に得た種培養物を1% (v/v) 接種し、同じ温度で8時間連続培養した。培養物を遠心分離して菌体を採取し、150mM塩化ナトリウム、16mM磷酸水素ナトリウム及び84mM磷酸水素ナトリウムを含む混液(pH7.3)に悬浮させ、超音波破砕後、遠心分離により菌体破砕物を除去し、上清を採取した。

【0039】この上清を20°Cで硫酸アンモニウムを46% (w/v) まで加え、均一に溶解し、暫時静置し、 40 遠心分離後、上清を採取した。この上清を予め1.5M硫酸アンモニウムを含む150mM磷酸緩衝液(pH6.6)に溶解し、溶液を予め1.5M硫酸アンモニウムを含む10mM磷酸緩衝液(pH6.6)により平衡化しておいたファルマシア製『フェニル・セファローブ』のカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1.5Mから0Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、10mM磷酸緩衝液(pH6.6)を通液した。

【0040】つぎに、硫酸アンモニウム濃度1.0M付

近で溶出した画分をプールし、膜濃縮後、10mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4°Cで18時間透析し、予め10mM磷酸緩衝液(pH6.5)により平衡化しておいた東ソー製『DEAE5PW』のカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、10mM磷酸緩衝液(pH6.5)を通液し、塩化ナトリウム濃度0.05M付近で溶出した画分を採取した。

【0041】その後、この画分を膜濃縮し、予め磷酸食塩緩衝液(以下、『PBS』と云う。)により平衡化しておいたファルマシア製『スーパー・デックス75』のカラムに負荷し、新鮮なPBSを通液して溶出した分子量18,500ダルトン付近の画分を採取したところ、精製蛋白質を約5.2mg含む水溶液が得られた。全精製工程を通じての収率は約10%であった。

【0042】特願平6-304203号明細書に記載した方法に準じて分析したところ、精製蛋白質は次のような理化学的性質を有していた。すなわち、非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量18,500 \pm 3,000ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能を有する主たるバンドを示す一方、クロマトフォーカシングすると、4.9 \pm 1.0に等電点を示した。また、そのN末端は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列におけるN末端にメチオニンが結合した配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0043】

【実施例1-3 ハイブリドーマH-1の調製】10週間BALB/cマウスの脾臓細胞に実施例1-2の方法により得た精製ポリペプチドを完全フロイドアジュバン1と共に20 μ g/10⁶細胞割合で注射接種した。その後、2週間おきに同一量を2回接種し、最後の接種から1週間後に同一量をさらに最終的に注射し、5日後に脾臓を取出し、分散して脾細胞を得た。

【0044】この脾細胞とマウスの骨髓腫瘍細胞SP2-O-Ag143細胞(ATCC-CRI1581)を37°Cに予温しておいた血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)にそれぞれ細胞密度 3×10^4 個/ml及び 1×10^4 個/mlになるように悬浮させ、遠心分離後、沈殿部を採取した。この沈殿部を平均分子量1,500ダルトン、0.50% (w/v) ポリエチレングリコールを含む血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)1mlを1分間かけて緩やかに加え、37°Cで1分間インキュベートした後、全量か5.0mlになるまで血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)を滴々加え、遠心分離後、沈殿部を採取した。この沈殿部をHAT培地に悬浮させ、96ウェルマイクロプレートに200 μ l/ウェルずつ分注し、37°Cで1週間インキュベートしてハイブリドーマを調製した。

【0045】各ウェルにおける培養上清中に分泌された抗体につき、実施例1-2の方法により得た精製ポリペ

プチトとの反応性をエンサイムイムノアッセイにより調べ、同精製ポリペプチドに反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選別した。引続き、このハイブリドーマに常法にしたがって限界希釈を繰返し適用し、この発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローンH-1を得た。

【0046】

【実施例2 モノクローナル抗体H-1 mAbの調製とウェスタンブロッティング分析】

【0047】

【実施例2-1 モノクローナル抗体H-1 mAbの調製】実施例1-3の方法により得たハイブリドーマH-1を細胞密度約 1×10^4 個/mlになるように5% (v/v) ウシ血清を補足したRPMI 1640培地 (pH 7.2) に浮遊させ、培養規模を拡大しながら、5% CO₂ インキュベーター中、37°Cで培養した。所期の細胞密度に達した時点で、ハイブリドーマH-1を予めプリスタンで0.5 ml/匹腹腔内注射しておいた8週齢のBALB/cマウスの腹腔内に 1×10^4 個/匹注射接種し、通常の方法で1週間融合した。

【0048】マウスから腹水を採取し、PBSで3倍希釈した後、硫酸アンモニウムを50%飽和になるように加え、4°Cで24時間放置し、遠心分離後、上清部を採取した。この上清を20 mM硫酸二ナトリウム水溶液 (pH 6.7) に対して4°Cで一晩透析した後、予め新鮮な同一水溶液で平衡化しておいたヒトインターロイキン12カラムに負荷し、濃度が20 mMから300 mMに直線的に上昇する硫酸二ナトリウム水溶液 (pH 6.7) を流液したところ、この発明のモノクローナル抗体H-1 mAbを含む水溶液が得られた。収量は、マウス1匹当たり、約5 mgであった。常法にしたがって分析したところ、このモノクローナル抗体H-1 mAbはIgGのクラスに属していた。

【0049】

【実施例2-2 ウェスタンブロッティング分析】プチト: イー・4 100 mg、10% (w/v) SDS水溶液0.5 ml及びグリセロール1 mlからなる混液に実施例1-2の方法により得た精製ポリペプチドを1 µg加え、37°Cで1時間インキュベートした後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。常法によりゲルをニトロセルロース膜に移し、ニトロセルロース膜をハイブリドーマH-1の培養上清に1時間浸漬した後、0.05% (v/v) ツイン20を含む50 mMトリシュード緩衝液 (pH 7.5) で洗浄して過剰の抗体を除いた。ニトロセルロース膜を西シワセビナーオキシダーゼで標識したウシ抗マウスIgG抗体を含むPBSに1時間浸漬して反応させ、0.05% (v/v) ツイン20を含む50 mMトリシュード緩衝液 (pH 7.5) で洗浄後、0.005% (v/v) 過酸化水素と0.3 mg/mlジアミノベンジジンを含む50 mM

トリシュード緩衝液 (pH 7.5) に浸漬して発色させた。

【0050】同時に、精製ポリペプチドに代えて組換え型ヒトインターロイキン12を用いる系を設け、上記と同様に処置して対照とした。なお、分子量マーカーには、ウシ血清アルブミン (67,000ダルトン)、オホアルブミン (45,000ダルトン)、カルボニックアンヒドラーゼ (30,000ダルトン)、トリプシンインヒビター (20,100ダルトン) 及びα-ラクトアルブミン (14,400ダルトン) を用いた。結果を図2に示す。

【0051】図2の結果に見られるように、モノクローナル抗体H-1 mAbは、実施例1-2の方法により得た精製ポリペプチド (レーン1) にのみ特異的に反応し、ヒトインターロイキン12 (レーン2) には全く反応しなかった。このことは、この発明のモノクローナル抗体が特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に反応することを表付けている。

【0052】

【実施例3 ハイブリドーマH-2及びモノクローナル抗体H-2 mAbの調製】

【0053】

【実施例3-1 ハイブリドーマH-2の作製】実施例2-1において、SP2-0-14 Ag細胞に代えてマウス骨髄細胞株のP3-X63-Ag8細胞 (ATCC TIB9) を用いた場合、同様に処置して単クローン化されたハイブリドーマH-2を得た。

【0054】

【実施例3-2 モノクローナル抗体H-2 mAbの調製】実施例3-1で得たハイブリドーマH-2を実施例2-1と同様にして培養し、培養物を精製したところ、BALB/cマウス1匹当たり、約5.6 mgのモノクローナル抗体H-2 mAbが得られた。常法により分析したところ、このモノクローナル抗体H-2 mAbはIgMのクラスに属していた。また、実施例2-2と同様にしてウェスタンブロッティング分析したところ、実施例1-2の方法により得た精製ポリペプチドにのみ特異的に反応した。

【0055】

【実施例4 イムノアフィニティークロマトグラフィーによるポリペプチドの精製】

【0056】

【実施例4-1 イムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲルの調製】実施例2-1の方法により得たモノクローナル抗体H-1 mAbを80 mgとり、0.5 M塩化ナトリウムを含む、1 M磷酸緩衝液 (pH 8.5) に対して4°Cで一晩透析した。水溶性担体としてフタルマンア製『CNBr-活性化セファロース4B』4 gを1 mM磷酸水溶液中で膨潤させ、新鮮な同一磷酸水溶液、0.5 M塩化ナトリウムを含む0.1 M磷酸緩

10

20

30

40

50

衝液 (pH 8.5) の順序で洗浄した後、上記のモノクローナル抗体水溶液約 1.0 ml を加え、室温下で 2 時間、4℃ でさらに一晚緩やかに撹拌した。その後、ゲルを 1 M エタノールアミン水溶液 (pH 8.0) で洗浄し、さらに、0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 硼酸緩衝液 (pH 8.5) 及び 0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 硼酸緩衝液 (pH 4.0) をこの順序で用いて洗浄する工程を 5 回繰返し、最後に PBS で洗浄してイムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲルを得た。常法により分析したところ、ゲル 1 ml 当たり、約 6 mg のモノクローナル抗体 H-1 mAb が結合していた。

【0057】

【実施例 4-2 イムノアフィニティークロマトグラフィーによるポリペプチドの精製】実施例 4-1 で得たイムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲル 1.0 ml をプラスチック製円筒管内部にカラム状に充填し、PBS で洗浄後、実施例 1-2 の方法により得た当該ポリペプチドを約 0.1 mg/ml 含むフェニルセファロース抽出液 1.0 ml を負荷した。新鮮な PBS で洗浄した後、カラムに 1 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M グリシン-硼酸緩衝液 (pH 2.5) を通液し、1 FN-α 試薬は含有成分を採取した。採取した成分をプールし、PBS に対して 4℃ で一晚撹拌し、濃縮後、1 FN-α 試薬活性及び蛋白質量を測定したところ、純度 95% 以上の精製ポリペプチドが、原料当たり、ほぼ 100% の収量で得られていた。

【0058】

【実施例 5 エンサイムイムノアッセイによるポリペプチドの検出】常法にしたがって、実施例 1-2 の方法により得た精製ポリペプチドでウサギを免疫感作した後、血清を採取し、1 gG 抗体を単離した。この 1 gG 抗体を PBS に 2.0 μg/ml になるように溶解し、96 ウェルマイクロプレートに 100 μl/ウェルずつ添加した。マイクロプレートを室温下で 3 時間インキュベーションした後、1 gG 溶液を除き、1% (w/v) ウェル血清アルブミンを含む PBS を 200 μl/ウェルずつ加え、4℃ で一晚静置した。

【0059】マイクロプレートから PBS を除き、0.05% (v/v) ツイーン 20 を含む PBS で洗浄後、実施例 1-2 の方法により得た精製ポリペプチドを 0.5% (w/v) ウェル血清アルブミンを含む PBS により適量濃度に希釈して 100 μl/ウェルずつ加え、撹拌後、室温下で 2 時間反応させた。0.05% (v/v) ツイーン 20 を含む PBS で洗浄し、ビオチン標識したモノクローナル抗体 H-1 mAb を 100 μl/ウェルずつ加え、撹拌しながら室温下で 2 時間反応させ、0.05% (v/v) ツイーン 20 を含む PBS で洗浄した後、西洋ワサビペーオキシダーゼとブロードアビジンとの複合体を 100 μl/ウェルずつ加え、撹拌しながら

ら室温下でさらに 2 時間反応させた。0.05% (v/v) ツイーン 20 を含む PBS で洗浄後、精製ポリペプチドに結合した西洋ワサビペーオキシダーゼの活性を o-フェニレンジアミンを基質に波長 492 nm における吸光度として測定した。結果を表 1 に示す。

【0060】

【表 1】

ポリペプチド濃度 (pg/ml)	吸光度 (A ₄₉₂) *	相対誤差 (%)
1,000	1.51 ± 0.05	5.3
500	0.93 ± 0.05	5.4
250	0.55 ± 0.03	5.5
100	0.25 ± 0.02	8.0
50	0.137 ± 0.007	5.1
25	0.080 ± 0.007	8.8
0	0.024 ± 0.007	—

註) * それぞれのポリペプチド濃度につき 3 回ずつ測定し、統計処理した数値である。

【0061】表 1 の結果から明らかなように、本検出方法によるときは、少なくとも約 50 乃至 1,000 pg/ml の当該ポリペプチドを精製度よく出し得る。

【0062】

【実施例 6 ラジオイムノアッセイによるポリペプチドの検出】常法にしたがって、実施例 1-2 の方法により得た精製ポリペプチドでウサギを免疫感作した後、血液を採取し、1 gG 抗体を単離した。この 1 gG 抗体を常法によりラジオイムノアッセイ用ポリスチレンビーズに吸着させ、2% (w/v) ウェル血清アルブミンを含む PBS 中、4℃ で一晚静置して同種抗体を得た。

【0063】試験管はこの同種抗体を 1 個ずつとり、実施例 1-2 の方法により得た精製ポリペプチドを 0.5% (w/v) ウェル血清アルブミンを含む PBS により適量濃度に希釈して 0.2 ml/管ずつ加え、4℃ で 4 時間静置した。同種抗体を 0.05% (v/v) ツイーン 20 と 0.5% (w/v) ウェル血清アルブミンを含む PBS で洗浄した後、実施例 3-2 の方法により得たモノクローナル抗体 H-2 mAb を常法により ¹²⁵I 標識して 0.2 ml (1 × 10⁴ cpm) ずつ加え、4℃ で一晚静置した。過剰の標識抗体を除去し、0.05% (v/v) ツイーン 20 と 0.5% (w/v) ウェル血清アルブミンを含む PBS で洗浄した後、ガンマカウンタによりビーズの放射能を測定した。結果を表 2 に示す。

【0064】

【表 2】

15

ポリペプチド濃度 (pg/ml)	カウント数*	相対誤差 (%)
1,000.0	6,900±200	2.9
500.0	4,100±20	0.5
250.0	2,390±50	2.1
125.0	1,590±70	4.4
62.5	880±10	1.1
0	700±20	—

註)* それぞれのポリペプチド濃度につき3回ずつ測定し、統計処理した数値である。

【0065】表2の結果から明らかなように、本検出方法によるときには、少なくとも約100乃至1,000pg/mlの当該ポリペプチドを精度良く検出できる。

【0066】

【発明の効果】以上説明したごとく、この発明のモノク

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp
1 5 10 15
Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr
20 25 30
Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met
35 40 45 50
Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys
55 60 65
Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu
70 75 80 85
Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe
90 95 100
Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
105 110 115
Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu
120 125 130 135
Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val
140 145 150
Gln Asn Glu Asp
155

【0069】配列番号:2

配列の長さ:471

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to mRNA

起源

配列

TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TIG AAT 48
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
1 5 10 15

16

ローナル抗体は、免疫担当細胞においてIFN-γの産生を誘導するポリペプチドに特異的に反応する。したがって、この発明のモノクローナル抗体は、斯かるポリペプチドの精製及び検出に多種多様の用途を有することとなる。斯くも有用なこの発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを用いる製造方法により、所望量を容易に得ることができる。

【0067】この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。

【0068】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:157

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ポリペプチド

40 生物名:ヒト

組織の種類:肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号:mat peptide

存在位置:1..471

特徴を決定した方法:S

17		18	
GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT	96		
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp			
20	25	30	
ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CCG ACC ATA TTT ATT	144		
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile			
35	40	45	
ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC	192		
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile			
50	55	60	
TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT	240		
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile			
65	70	75	80
ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA	288		
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys			
85	90	95	
AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG	336		
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys			
100	105	110	
ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA CGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA	384		
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu			
115	120	125	
AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG	432		
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu			
130	135	140	
GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC	471		
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp			
145	150	155	

【0070】配列番号:3

配列の長さ:11

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端フラグメント

配列

Met Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser

1

5

10

【0071】配列番号:4

配列

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln

1

5

10

15

Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys

20

25

【0072】配列番号:5

配列の長さ:18

配列の型:アミノ酸

配列

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro

1

5

10

15

Gln

【0073】配列番号:6

50 配列の長さ:471

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

30 トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

組織の種類：肝臓

配列の特徴

配列を表わす記号：mat peptide

存在位置：1..471

特徴を決定した方法：S

配列

```

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT   48
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
1           5           10           15
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG   96
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
20           25           30
ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA   144
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
35           40           45
TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT   192
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
50           55           60
GTG AAG GAT AGT AAA AVG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT   240
Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
65           70           75           80
TCC TTT GAC CAA ATG GAT CCA CTT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT   288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
85           90           95
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG   336
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
100          105          110
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA   384
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
115          120          125
GAT GAT GAT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT   432
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
130          135          140
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA ATT   471
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
145          150          155

```

【図面の簡単な説明】

【図1】組換えDNA pKGFHH2の構造を示す図である。

【図2】この発明によるモノクローナル抗体H-1mAbと精製ポリペプチド及びヒトインターロイキン12との反応性を示すウェスタンブロッティング図である。

【符号の説明】

KGFHH2 cDNA ポリペプチドをコードす

るcDNA

P t a c

40 r r n B T 1 T 2

シの転写終止領域

Amp R

o r i

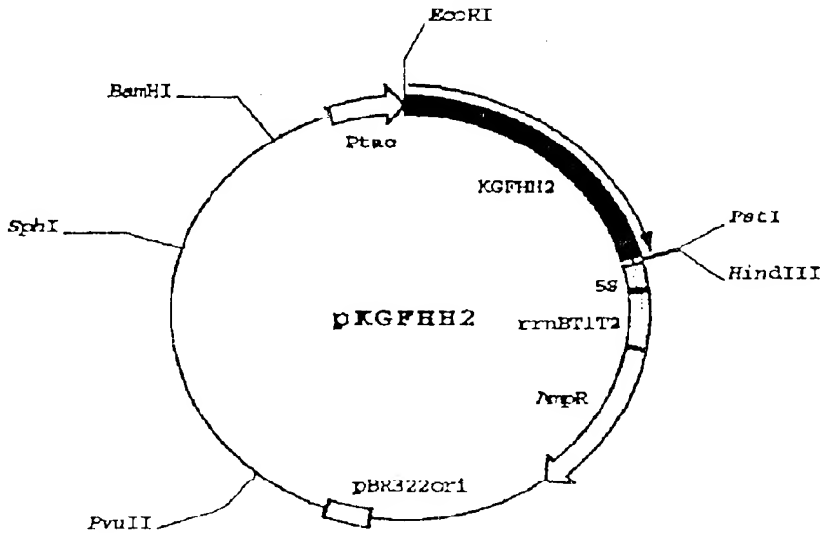
点

t a c プロモータ

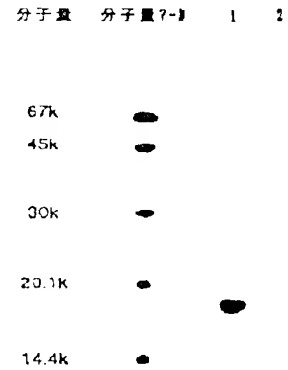
リボゾームRNAオペロ

アンピシリン耐性遺伝子
大腸菌における複製開始

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成7年8月31日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項8

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項8】 培養物又は体液からモノクローナル抗体を塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項6又は7に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】これら知見に基づき、ヒト肝細胞を引続き検索したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するさらに別の新規抗原をコードするDNAが得られた。この物質の本質はポリペプチドであり、DNAを解読したところ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を含んでなることが判明した。その後、このDNAを大腸菌に導入し、発現させたところ、培養物中にポリペプチドが大量に産生した。以上の知見は、同じ特許出願人による特願平6-184162号明細書及び特願平6-304203号明細書に開示されている。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正内容】

【0030】この発明のモノクローナル抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによる当該ポリペプチドの精製にきわめて有用である。斯かる精製方法は、この発明のモノクローナル抗体を当該ポリペプチドと当該ポリペプチド以外の可溶性蛋白質を始点とする夾雑物質との混合物に接触させてモノクローナル抗体に当該ポリペプチドのみを吸着させる工程と、吸着したポリペプチドをモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなり、同一工程は、通常、水性媒体中で行なわれる。この発明のモノクローナル抗体は、通常、ゲル状の水不溶性担体に結合した状態で用いられ、その水不溶性担体を円筒管などにカラム状に充填し、これに、例えば、形質転換体の培養液又はその成分精製品を通液すると、実質的に当該ポリペプチドのみが水不溶性担体上のモノクローナル抗体に吸着する。吸着したポリペプチドはモノクローナル抗体周囲の水素イオン濃度を変えることにより容易に脱着させることができ、例えば、IgGのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合は酸性側のpH、通常、pH2乃至3で、一方、IgMのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合はアルカリ側のpH、通常、pH10乃至11で脱着・溶出させる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正内容】

【0037】そこで、常法にしたがって残りの組換えDNAを制限酵素EcoRI及びHindIIIで切断後、宝酒造製DNAライゲーションキット『DNAライゲーション・キット・バージョン2』を使用して、得られたEcoRI-HindIII DNA断片0.1 μ gと予め同じ制限酵素で切断しておいたファルマン製プラスミドベクター『pKK223-3』10ngを16℃で30分間反応させて連結して複製可能な組換えDNA『pKGFHH2』を得た。コンピテントセル法により、この組換えDNA pKGFHH2で大腸菌Y1090株(ATCC37197)を形質転換し、得られた形質転換体『KGFHH2』を50 μ g/mlアンピシリンを含むL-ブロス培地(pH7.2)に接種し、37℃で18時間発育培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、その一部に通常のSDS-アルカリ法を適用して組換えDNA pKGFHH2を抽出した。ジデオキシ法により分析したところ、図1に示すように、組換えDNA pKGFHH2においては、配列表における配列番号2に示す塩基配列を含むKGFHH2 cDNAがTacプロモータの下流に連結されていた。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正内容】

【0046】

【実施例2】モノクローナル抗体H-1mAbの調製とウェスタンブロッティング分析】

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】符号の説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【符号の説明】

KGFHH2 cDNA	ポリペプチドをコードするcDNA
Ptac	tacプロモータ
rrnBT1T2	リボソームRNAオペロンの転写終止領域
Amp ^R	アンピシリン耐性遺伝子
pBR322ori	大腸菌における複製開始点

【手続補正7】

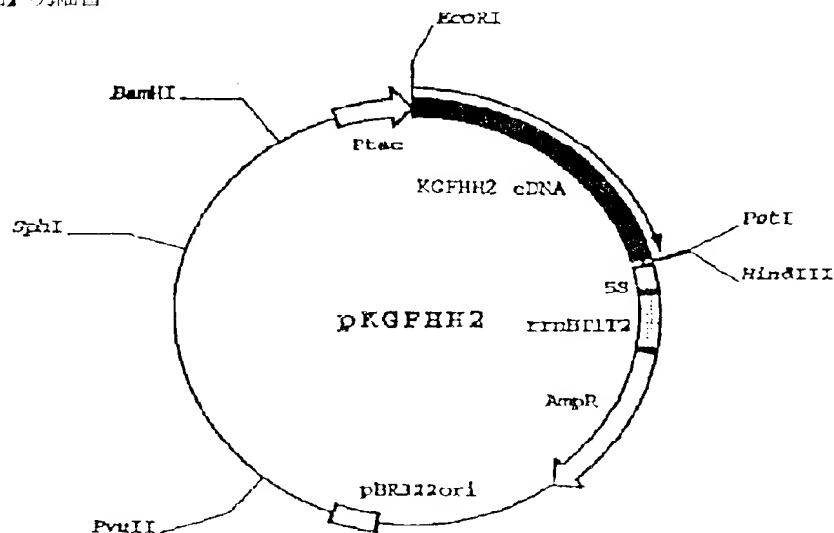
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

C12N

5/30

5/34

5/10

識別記号

片内整理番号

F1

技術表示箇所

15/02 ZNA
 C12P 21/08
 G01N 33/53
 33/577
 // A61K 38/21
 39/395
 (C12P 21/08
 C12R 1:91)

8517-4H

C07K 16/24

1/16

1/18

1/22

1/26

1/30

1/34

C12P 21/08

G01N 33/53

33/577

A61K 39/395

9281-4B

C12N 5/00

9162-4B

15/00

A61K 37/66

D
 B
 U
 B
 ZNA C
 A

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Monoclonal antibody

[Claims] 1. A monoclonal antibody which is specific to a polypeptide having either the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 (where the symbol "Xaa" represents "isoleucine" or "threonine") or a homologous amino acid sequence thereunto, and inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells.

2. The monoclonal antibody as claimed in claim 1, which belongs to the class of IgG or IgM.

3. The monoclonal antibody as claimed in claim 1 or 2, which is H-1mAb or H-2mAb.

4. A hybridoma which produces the monoclonal antibody as claimed in claim 1, 2 or 3.

5. The hybridoma as claimed in claim 4, which is hybridoma H-1 or H-2.

6. A process for preparing monoclonal antibody, which comprises culturing a hybridoma capable of producing the monoclonal antibody as claimed in claim 1, 2 or 3 *in vitro*, i.e. in a nutrient culture medium, or *in vivo*, i.e. in the body of an animal, and collecting the hybridoma from the resultant culture or the body fluid.

7. The process as claimed in claim 6, wherein said hybridoma is hybridoma H-1 or H-2.

8. The process as claimed in claim 7, wherein said monoclonal antibody is collected from the culture or the body fluid by salting out, dialysis, filtration, concentration, centrifugation, separatory sedimentation, gel filtration

chromatography, ion-exchange chromatography, affinity chromatography, gel electrophoresis, and/or isoelectrophoresis.

9. A process for purifying a polypeptide, which comprises contacting with the monoclonal antibody of claim 1, 2 or 3 a mixture containing impurities and a polypeptide having either the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 (where the symbol "Xaa" represents "isoleucine" or "threonine") or a homologous amino acid sequence thereunto, and inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells; and desorbing the polypeptide adsorbed on the monoclonal antibody.

10. The process as claimed in claim 9, wherein said monoclonal antibody is linked to a water-insoluble carrier.

11. A method for detecting a polypeptide which has either the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 (where the symbol "Xaa" represents "isoleucine" or "threonine") or a homologous amino acid sequence thereunto, and induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, said method containing a step of contacting the monoclonal antibody as claimed in claim 1, 2 or 3 with a sample to effect immunoreaction.

12. The method as claimed in claim 11, wherein said monoclonal antibody is labelled with a radioactive substance, enzyme and/or fluorescent substance.

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

The present invention relates to a novel monoclonal antibody, more particularly, to a monoclonal antibody which is specific to a polypeptide capable of inducing the interferon- γ (hereinafter abbreviated as "IFN- γ ") production by immunocompetent

cells.

[Prior Art]

It is known that IFN- γ is a protein which has antiviral-, antioncotic- and immunoregulatory-activities, and is produced by immunocompetent cells stimulated with antigens or mitogens. Because of these biological activities, IFN- γ is expected to be used as an antitumor agent from the beginning of the finding, and is studied energetically on clinical trials as a therapeutic agent for malignant tumors in general including brain tumors. IFN- γ preparations now commercially available are roughly classified into 2 groups, i.e. natural IFN- γ s produced by immunocompetent cells and recombinant IFN- γ s produced by transformants obtained by introducing into microorganisms of the species *Escherichia coli* DNAs which encode such natural IFN- γ s. In the above clinical trials, one of these IFN- γ s is administered to patients as an "exogenous IFN- γ ".

Among these IFN- γ s, natural IFN- γ s are usually produced by culturing established immunocompetent cells in nutrient culture media supplemented with IFN- γ inducers to form IFN- γ s, and purifying the formed IFN- γ s. It is known that the type of IFN- γ inducers greatly influence on the IFN- γ yield, as well as on the facility of IFN- γ purification and the safeness of the final products. Generally, mitogens such as concanavalin A (Con A), *lens culinaris*, *Phytolacca americana*, endotoxin and lipopolysaccharide are used as an IFN- γ inducer. However, these mitogens have problems on their molecular varieties and quality changes depending on their origins and purification methods, as well as the difficulty of obtaining a desired amount of preparations with a constant IFN- γ inducibility. In addition,

most of these mitogens induce unfavorable side effects when administered to living bodies, and some of them even cause toxicity, so that it is substantially difficult to induce the IFN- γ production by direct administrations to living bodies.

The present inventors found in mouse liver a substance which induces the IFN- γ production during their research of cytokines produced from mammalian cells. They isolated the substance by using a variety of purification methods comprising column chromatography as a main technique, and studied the properties and features, revealing that the reality was a protein having the following physicochemical properties:

(1) Molecular weight

Exhibiting a molecular weight of $19,000 \pm 5,000$ daltons on sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(2) Isoelectric point (pI)

Exhibiting an isoelectric point of 4.8 ± 1.0 on chromatofocusing;

(3) Partial amino acid sequence

Having the partial amino acid sequences in SEQ ID NOs:4 and 5; and

(4) Biological activity

Inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells.

It can be concluded that it is a novel substance because no protein with these physicochemical properties has been known. The present inventors continued studies on mouse liver cells and have found that the DNA of the substance consists of 471 base pairs and encodes the amino acid sequence in SEQ ID NO:6.

Based on these findings, the present inventors continued studies on human liver cells and have obtained a DNA which encodes another novel substance that induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. They revealed the reality is a polypeptide and decoded its DNA and revealed that the polypeptide has the amino acid sequence in SEQ ID NO:1. They introduced the DNA into *Escherichia coli* to express the polypeptide and to obtain the polypeptide in the resultant culture in a considerably high yield. These findings were disclosed in Japanese Patent Application Nos.184,162/94 and 304,203/94, applied by the present inventors.

As is described above, the polypeptide has a property of inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells, and is expected to be used in a variety of fields as an IFN- γ inducer, antiviral agent, antitumor agent, antibacterial agent, immunoregulatory agent, and blood platelet enhancing agent. In general, the developments of methods for efficiently purifying biologically active polypeptides to give a relatively-high purity and those for assaying many samples in parallel are inevitably required when the polypeptides should be incorporated into pharmaceuticals. Although the best material enabling these purification and assay is a monoclonal antibody, none of which is specific to the polypeptide has been established.

[Object of the Invention]

In view of the foregoing, the object of the present invention is to provide a monoclonal antibody which is specific to the polypeptide.

It is another object of the present invention to provide a hybridoma capable of producing the monoclonal antibody.

It is further object of the present invention to provide

a method for preparing the monoclonal antibody.

It is yet another object of the present invention to provide a purification method for purifying the polypeptide using the monoclonal antibody.

It is another object of the present invention to provide a detection method for assaying the polypeptide using the monoclonal antibody.

[Means to Attain the Object]

The first object of the present invention is attained by a monoclonal antibody which is specific to a polypeptide having either the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 or a homologous amino acid sequence thereunto, and induces the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The second object of the present invention is attained by a hybridoma capable of producing the monoclonal antibody.

The third object of the present invention is attained by a process for preparing the monoclonal antibody comprising culturing the hybridoma capable of producing the antibody *in vitro*, i.e. in a nutrient culture medium, or *in vivo*, i.e. in an animal, and collecting the antibody from the resultant culture or the body fluid.

The fourth object of the present invention is attained by a purification method for polypeptide comprising contacting the monoclonal antibody with a mixture containing the polypeptide and impurities to adsorb the polypeptide thereunto, and desorbing the polypeptide from the antibody.

The fifth object of the present invention is attained by a method for detecting the polypeptide comprising contacting samples with the monoclonal antibody to effect immunological

reaction to detect the polypeptide.

[Function]

The monoclonal antibody according of the present invention specifically reacts with a polypeptide having a specific amino acid sequence.

The hybridoma according to the present invention produces the monoclonal antibody when cultured *in vitro*.

The preparation of the monoclonal antibody according to the present invention facilitates its production in a desired amount.

The purification method of the polypeptide according to the present invention efficiently recovers it in a relatively-high quality from a mixture containing the polypeptide and impurities.

In the detection method according to the present invention, only the polypeptide in samples exhibits an immunological reaction. When the immunoreaction level is measured on an appropriate technique, the polypeptide can be qualitatively or quantitatively assayed.

Explaining now the present invention with reference to the Examples in the present specification, the monoclonal antibody according to the present invention includes those in general which are specific to the polypeptide having the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 or homologous ones thereunto, independently of their source, origin or class. The homologous amino acids include those which are obtained by replacing one or more amino acids in SEQ ID NO:1 with other amino acids, by adding one or more amino acids to the N- and/or C-termini in the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, or by losing one or more amino acids in the N- and/or C-termini of the amino acid sequence in SEQ ID NO:1, while substantially not

losing the activity of inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The monoclonal antibody according to the present invention can be obtained by using the polypeptide or its antigenic fragments: For example, the antibody can be obtained by preparing hybridomas using mammalian cells capable of infinite proliferation and antibody-producing cells collected from mammals immunized with the fragments, selecting clones of hybridomas capable of producing the monoclonal antibody, and culturing the clones *in vivo* or *in vitro*.

The polypeptide as an antigen can be obtained by culturing transformants into which a DNA encoding the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 and or a homologous one was introduced, and, generally, they are used intact or in a partially purified form. The antigenic fragments can be prepared by chemically or enzymatically hydrolyzing the wholly or partially purified polypeptide, or synthesized by peptide synthesis based on the amino acid sequence in SEQ ID NO:1.

The immunization method usable in the present invention includes conventional ones: For example, antigens alone or in combination with adequate adjuvants are injected into mammals intravenously, intradermally, subcutaneously or intraperitoneally, and they are fed for a prescribed period. Any mammal can be used in the present invention without special restriction as long as desired antibody-producing cells can be obtained independently of the animal's species, weight and sex. In general, rodents such as rats, mice and hamsters are used, and from which the most suitable animal is selected while evaluating the compatibility with the above mammalian cells capable of infinite proliferation.

Depending on the species and weight of animals used, the total dose of the antigens is generally in the range of about 5-500 µg per animal and administered to 2-5 times at an interval of 1-2 weeks. On 3-5 days after the final administration, the animal's spleen is extracted and dispersed into a suspension of spleen cells as an antibody-producing cell.

The antibody-producing cells and the mammalian cells obtained in the above are fused into a cell fusion mixture containing the objective hybridomas. The mammalian cells capable of infinite proliferation include cell strains from mouse myeloma such as P3-NS1-Ag4-1 cells (ATCC TIB18), P3-X63-Ag8 cells (ATCC TIB9), SP2/O-Ag14 cells (ATCC CRL1581), and mutants thereof. The cell fusion method usable in the present invention includes conventional ones using an electric pulse and a cell fusion-accelerator such as polyethylene glycol and sendai virus (HVJ): For example, antibody-producing cells and such mammalian cells are suspended in fusion media containing fusion accelerators in a ratio of about 1:1 to 1:10, and incubated at about 30-40°C for about 1-5 min. Conventional media such as minimum essential medium (MEM), RPMI 1640 medium, and Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) are preferably used as a fusion medium without addition of serums such as calf serum.

To select the objective hybridomas, the resultant cell fusion mixture was transferred to selection media such as HAT medium, and incubated at about 30-40°C for about 3 days to 3 weeks to die cells except for the hybridomas. The hybridomas were cultured in usual manner, and antibodies secreted in the cultures were assayed for reactivity with the polypeptide. Examples of such an assay are conventional ones for detecting antibodies such

as an enzyme immunoassay, radioimmunoassay, and bioassay. For example, "Tan-Clone-Kotai-Jikken-Manual (Experimental Manual for Monoclonal Antibody)", edited by Sakuji TOYAMA and Tamie ANDO, published by Kodansha Scientific, Ltd., Tokyo, Japan, pp.105-152 (1991) describes a variety of them. Hybridomas, which produce antibodies that are specific to the polypeptide, are readily cloned by limiting dilution to obtain the hybridoma according to the present invention.

The monoclonal antibody according to the present invention can be obtained by culturing the hybridoma *in vivo*, i.e. in animals, or *in vitro*. For the culture conventional methods for culturing mammalian cells can be used: For example, in case of *in vivo* culture, the monoclonal antibody is collected from the animals' ascites and/or blood. The hybridomas H-1 and H-2 as described in the below have an enhanced producibility of the monoclonal antibody and have a character of being readily cultured *in vivo* and *in vitro*. Conventional methods used to purify antibodies in general can be used to collect the monoclonal antibody from the cultures, and animal's ascites and blood. Examples of such include salting out, dialysis, filtration, concentration, centrifugation, separatory sedimentation gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, affinity chromatography, high-performance liquid chromatography (HPLC), gel electrophoresis, and isoelectrophoresis, and, if necessary, two or more of these techniques can be used in combination. The resultant purified monoclonal antibodies can be concentrated or dried into products in the form of a liquid or a solid to meet to their final use.

The present monoclonal antibody is extremely useful for purifying the present polypeptide on immunoaffinity chromatography. Such a purification technique comprises contacting the monoclonal antibody with a mixture containing the polypeptide and impurities such as proteins except for the polypeptide to adsorb the polypeptide on the antibody, and desorbing the polypeptide from the antibody. These steps are generally carried out in an aqueous system. The monoclonal antibody is generally used in an immobilized form to gel water-insoluble carriers which are packed in cylindrical columns. Cultures of transformants or their partially purified products are fed to the columns to substantially adsorb the polypeptide on the monoclonal antibody. The polypeptide is readily desorbed from the antibody by alternating the pH around the antibody. For example, in the case of using a monoclonal antibody of the class IgG, the adsorbed polypeptide is desorbed and eluted from the columns at an acidic pH, usually, a pH of 2-3, while in the case of using a monoclonal antibody of the class IgM, the polypeptide is desorbed and eluted from the columns at an alkaline pH, usually, a pH of 10-11.

The purification method according to the present invention attains a relatively-high level purification of the polypeptide with only the minimum labor cost and time. As is described above, the polypeptide has an activity of inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells, and the purified polypeptide can be used as an IFN- γ inducer for cell culture to produce IFN- γ , and used in the treatment and/or the prevention of virus diseases such as AIDS and condyloma, malignant tumors such as renal cancer, granuloma, mycosis fungoides, and cerebral tumor,

and immune diseases such as articular rheumatism and allergy. If the polypeptide has an activity of enhancing the cell cytotoxicity of killer cells, it can be used together with interleukin 2 and/or tumor necrosis factor to improve the therapeutic effect and reduce the side effects in the treatment of adoptive immunity for malignant tumors including solid tumors such as lung cancer, renal cancer, and breast cancer.

The monoclonal antibody according to the present invention has a relatively-wide applicability to a variety of fields which require the detection of the polypeptide. When used in labelled immunoassays such as radioimmunoassay, enzyme immunoassay, and fluorescent immunoassay, the monoclonal antibody can qualitatively and quantitatively detect the polypeptide in samples instantly and accurately. In such assays, the monoclonal antibody is labelled, for example, with radioisotopes, enzymes and/or fluorescent substances prior to use. The antibody specifically reacts with the polypeptide to exhibit an immunoreaction, and accurately detects a slight amount of the polypeptide in samples by measuring the level of the immunoreaction for these labelled substances. As compared with bioassay, labelled immunoassay has the following features: It can assay many samples in parallel, reduce the assaying time and labor cost, and provide data with a relatively high in accuracy. Thus, the present detection method is useful for controlling the production steps of the polypeptide and for the quality control of the final products. Although the present invention does not describe in detail the techniques for labelling monoclonal antibody or labelling assay because it does not in itself relate to such an invention, these techniques are described in detail in

"Enzyme Immunoassay", edited by P. Tijssen, translated by Eiji ISHIKAWA, published by Tokyo-Kagaku-Dojin, pp.196-348 (1989).

The following Examples explain the present invention, and can be variously modified by conventional methods in this art. In view of this, this invention should not be restricted to these Examples:

Example 1

Preparation of hybridoma H-1

Example 1-1

Preparation of transformant KGFHH2

To a 0.5-ml reaction tube were added 8 μ l of 25 mM magnesium chloride, 10 μ l of 10xPCR buffer, one μ l of 25 mM dNTP mix, one μ l of 2.5 units/ μ l of AmpliTaq DNA polymerase, one ng of a recombinant DNA containing the base sequence in SEQ ID NO:2 prepared from a phage DNA clone according to the method in Japanese Patent Application No.304,203/94 and containing a DNA encoding the polypeptide in SEQ ID NO:1, and an adequate amount of a sense primer and an anti-sense primer represented by 5'-ATAGAATTCAAATGTACTTTGGCAAGCTTGAATC-3', chemically synthesized based on an amino acid sequence near the N- and C-termini of SEQ ID NO:1, and 5'-ATAAACCTTCTAGTCTTCGTTTGAAC-3', and the mixture solution was volumed up with sterilized distilled water to give a total volume of 100 μ l. The mixture solution was in usual manner successively incubated at 94°C for one min, at 43°C for one min, and at 72°C for one min, and this sequential incubation was repeated 3 times. The resultant mixture was further successively incubated at 94°C for one min, at 60°C for one min, and at 72°C for one min, and this sequential incubation was repeated 40 times to effect PCR reaction.

The resultant PCR reaction mixture and "pCR-Script SK (+)", a plasmid vector commercialized by Stratagene Cloning Systems, California, USA, were ligated with DNA ligase to obtain a recombinant DNA which was then introduced with competent cell into "*Escherichia coli* XL-1 Blue MRF'Kan", a microorganism commercialized by Stratagene Cloning Systems, California, USA, to transform the microorganism. The transformant thus obtained was inoculated into L-broth (pH 7.2) containing 50 µg/ml ampicillin, and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions, followed by centrifuging the resultant culture to collect the proliferated transformants, and isolating recombinant DNAs with conventional alkaline-SDS method. A part of the recombinant DNAs was provided, analyzed on dideoxy method, and revealed that it contained a DNA which has cleavage sites of *Eco* RI and *Hind* III at the 5'- and 3'-termini of SEQ ID NO:2, a methionine codon which initiates the polypeptide synthesis and positions in the sites corresponding to the those before and after the N- and C-termini of SEQ ID NO:2, and a TAG codon which terminates the polypeptide synthesis.

The remaining recombinant DNAs were cleaved with restriction enzymes *Eco* RI and *Hind* III, and 0.1 µg of the resultant *Eco* RI-*Hind* III DNA fragment obtained with "DNA LIGATION KIT Version 2", a DNA ligation kit commercialized by Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan, and 10 ng of "pKK223-3", a plasmid vector commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been previously cleaved with the above restriction enzymes, were ligated by incubating them at 16 C for 30 min to obtain a replicable recombinant DNA "pKGFHH2". By using competent

cell method, *Escherichia coli* Y1090 strain (ATCC 37197) was transformed with the replicable recombinant DNA pKGFHH2, and the formed transformant "KGFHH2" was inoculated into L-broth (pH 7.2) containing 50 µg/ml ampicillin, and incubated at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The resultant culture was centrifuged to collect the proliferated transformants, and a portion of which was treated with conventional SDS-alkaline method to extract the recombinant DNA pKGFHH2. As is shown in FIG.1, the analysis of dideoxy method revealed that, in the recombinant DNA pKGFHH2, the KGFHH2 cDNA which contained the base sequence in SEQ ID NO:2 was ligated to the downstream of a Tac promoter.

Example 1-2

Production of polypeptide from transformant KGFHH2

An L-broth (pH 7.2) containing 50 µg/ml of ampicillin was sterilized by autoclaving, cooled to 37°C, inoculated with the transformant KGFHH2 in Experiment 1-1, and incubated at the same temperature for 18 hours under shaking conditions to obtain a seed culture. An eighteen L of a fresh preparation of the same medium was placed in a 20-L jar fermenter, sterilized similarly as above, cooled to 37°C, inoculated with one v/v % of the seed culture, and cultured at the same temperature for 8 hours under aeration and agitation conditions. The resultant culture was centrifuged to collect cells which were then suspended in a mixture solution (pH 7.3) consisting of 150 mM sodium chloride, 16 mM disodium hydrogen phosphate, and 4 mM sodium dihydrogen phosphate, disrupted with ultrasonic, and centrifuged to remove cell debris to obtain a supernatant.

Ammonium sulfate was added to the supernatant up to give a concentration of 40 w/v % and dissolved to homogeneity, and the

solution was centrifuged to obtain a supernatant. The supernatant was first mixed with 150 mM phosphate buffer (pH 6.6) containing 1.5 M ammonium sulfate, then fed to a column packed with "PHENYL SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 6.6) containing 1.5 M ammonium sulfate, followed by washing the column with a fresh preparation of the same buffer, and feeding to the column a gradient buffer of ammonium sulfate ranging from 1.5 M to 0 M in 10 mM phosphate buffer (pH 6.6).

Fractions eluted at around 1.0 M ammonium sulfate were pooled, membrane filtered, dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 6.5) at 4°C for 18 hours, and fed to a column packed with "DEAE 5PW", a product commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 6.5), followed by washing the column with a fresh preparation of the same buffer, and feeding to the column a linear gradient buffer of sodium chloride ranging from 0 M to 0.2 M in 10 mM phosphate buffer (pH 6.5) while collecting fractions eluting at 0.05 M sodium chloride.

Thereafter, the fractions were concentrated with a membrane and fed to a column packed with "SUPER DEX 75", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with phosphate buffered saline (hereinafter abbreviated as "PBS"), followed by feeding to the column a fresh preparation of PBS to collect fractions corresponding to about 18,500 daltons. Thus, an aqueous solution containing about 5.2 mg of a purified protein was obtained. The total yield throughout the purification was about 10%.

Analysis according to the method in Japanese Patent Application No.304,203/94 revealed that the purified protein had the following physicochemical properties: When electrophoresed in SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions, the purified protein appeared as a main protein band having an IFN- γ inducibility at a position corresponding to $18,500 \pm 3,000$ daltons, while giving a pI of 4.9 ± 1.0 on chromatofocusing. The amino acid sequence containing N-terminus of the purified protein had the amino acid sequence in SEQ ID NO:3 equal to that in SEQ ID NO:1 where methionine was coupled to its N-terminus.

Example 1-3

Preparation of hybridoma H-1

BALB/c mice, 10-week-old, were intraperitoneally injected with 20 μ g/mouse of a purified polypeptide, obtained by the method in Example 1-2, together with a complete Freund's adjuvant. The mice were further injected twice with the same dose at an interval of 2 weeks and intravenously injected with the same dose one week after the final injection, and their spleens were extracted and suspended to obtain a cell suspension.

The spleen cells and SP2/O-Ag14 cells from mouse myeloma (ATCC CRL 1581) were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.2) preheated to 37°C at cell densities of 3×10^5 cells/ml and 1×10^5 cells/ml, respectively, and centrifuged to collect sediment. One ml of a serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.2), containing 50 w/v % polyethylene glycol with an average molecular weight of 1,500 daltons, was added drop-wise to the sediment over a min, and the mixture was incubated at 37°C for a min, followed by adding drop-wise to the mixture a serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.2) up to give a total volume of 50 ml, centrifuging the mixture, and

collecting the formed sediment. The sediment thus obtained was suspended in HAT medium, distributed to 96-well microplates in an amount of 200 μ l/well, and incubated at 37°C for one week, followed by selecting hybridomas.

The amount of antibodies secreted in the supernatant in each well was assayed on enzyme immunoassay based on the immunoreaction of the antibodies and a purified polypeptide, obtained by the method in Example 1-2, and hybridomas capable of producing antibodies, which strongly react with the purified polypeptide, were selected. A cloned hybridoma H-1 cell capable of producing the present monoclonal antibody was in usual manner obtained by repeatedly treating these hybridomas with limiting dilution.

Example 2

Preparation of monoclonal antibody H-1mAb and its analysis on Western blot technique

Example 2-1

Preparation of monoclonal antibody H-1mAb

Hybridoma H-1 cells obtained by the method in Example 1-3 were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.2) supplemented with 5 v/v % calf serum to give a cell density of about 1×10^6 cells/ml, and incubated in an incubator at 37°C under 5 v/v % CO₂ conditions while scaling up the culture. When the cell density of the culture reached to a prescribed level, 1×10^7 cells/mouse of the proliferated hybridoma H-1 cells were intraperitoneally injected to BALB/c mice, 8-week-old, which had been previously intraperitoneally injected with 0.5 ml/mouse of pristane, followed by feeding the mice in usual manner for one week.

From the mice ascites were collected, diluted with PBS

by 3 times, mixed with ammonium sulfate to give a saturation degree of 50 w/v %, allowed to stand at 4°C for 24 hours, and centrifuged to collect sediment. The sediment was dialyzed against an aqueous solution of 20 mM potassium dihydrogen phosphate (pH 6.7) at 4°C overnight, and fed to a column of hydroxyapatite which had been previously equilibrated with a fresh preparation of the same aqueous solution, followed by feeding to the column a linear gradient potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 6.7) ranging from 20 mM to 300 mM to obtain an aqueous solution containing the present monoclonal antibody H-1mAb. The yield was about 5 mg per mouse. Conventional analysis revealed that the antibody belongs to the class of IgG₁.

Example 2-2

Analysis on Western blot technique

One µg of a purified polypeptide, obtained by the method in Example 1-2, was added to a mixture solution consisting of 100 mg dithiothreitol, 0.5 ml of an aqueous solution of 10 w/v % SDS, and one ml of glycerol, and the mixture was incubated at 37°C for one hour and electrophoresed in SDS-polyacrylamide gel. The resultant gel was in usual manner transferred to a nitrocellulose membrane which was then soaked in a culture supernatant of hybridoma H-1 cells for one hour, and washed with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.05 v/v % tween 20 to remove excessive amounts of antibodies. The membrane was further soaked for one hour in PBS containing an anti-mouse Ig antibody prepared from rabbits to effect immunoreaction, washed with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.05 v/v % tween 20, and soaked in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.005 v/v % hydrogen peroxide and 0.3 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine to effect coloration.

As a control, a system using a recombinant human interleukin 12 in place of the purified polypeptide was provided, and similarly treated as above. Calf serum albumin (MW=67,000 daltons), ovalbumin (MW=45,000 daltons), carbonic anhydrase (MW=30,000 daltons), trypsin inhibitor (MW=20,100 daltons), and α -lactalbumin (MW=14,400 daltons) were used as a marker protein. These results were in FIG.2.

As is evident from FIG.2, the monoclonal antibody H-1mAb specifically reacted with the purified polypeptide (lane 1) obtained by the method in Example 1, but did not with the human interleukin 12 (lane 2). This evidences that the present monoclonal antibody specifically reacts with a polypeptide with a specific amino acid sequence.

Example 3

Preparation of hybridoma H-2 and monoclonal antibody H-2mAb

Hybridoma H-2, a monoclonal antibody, was similarly prepared by the method in Example 2-1 except that P3-X63-Ag8 cells (ATCC TIB9) were used in place of the SP/O-14Ag cells.

Example 3-2

Preparation of monoclonal antibody H-2mAb

The hybridoma H-2 in Example 3-1 was cultured similarly as in Example 2-1, and the culture was purified to obtain an about 5.6 mg of monoclonal antibody H-2mAb per BALB/c mouse. Conventional analysis revealed that the monoclonal antibody belongs to the class of IgM, and it specifically reacted with a purified polypeptide obtained by the method in Example 1-2 when analyzed on Western blotting technique similarly as in Example 2-2.

Example 4

Purification of polypeptide on immunoaffinity chromatography

Example 4-1

Preparation of gel for immunoaffinity chromatography

Eighty mg of monoclonal antibody H-1mAb, obtained by the method in Example 2-1, was weighed and dialyzed against 0.1 M borate buffer (pH 8.5) containing 0.5 M sodium chloride at 4°C overnight. Four g of "CNBr-activated Sepharose 4B", a water-insoluble carrier commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, was swelled with one mM of aqueous chloric acid solution, successively washed with a fresh preparation of the same buffer and 0.1 M borate buffer (pH 8.5) containing 0.5 M sodium chloride, admixed with an about 10 ml of the aqueous monoclonal antibody solution obtained in the above, and successively incubated at ambient temperature and at 4°C overnight under gentle stirring conditions. Thereafter, the resultant gel was successively washed with one M aqueous ethanol amine solution (pH 8.0), 0.1 M borate buffer (pH 8.5) containing 0.5 M sodium chloride, and 0.1 M acetate buffer (pH 4.0), and these washing steps were repeated 5 times. Finally, the gel was washed with PBS to obtain a gel for immunoaffinity chromatography. Conventional analysis revealed that about 6 mg monoclonal antibody H-1mAb linked to one ml of the gel.

Example 4-2

Purification of polypeptide on immunoaffinity chromatography

Ten ml of the gel for immunoaffinity chromatography in Example 4-1 was packed in a plastic cylindrical column, washed with PBS, and fed with 10 ml of a Phenyl Sepharose eluted fraction containing about 0.1 mg/ml of the polypeptide obtained by the method in Example 1-2. The column was washed with a fresh

preparation of PBS, and fed with 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 2.5) containing one M sodium chloride to collect fractions with an IFN- γ inducing activity. The fractions were pooled, dialyzed against PBS at 4°C overnight, concentrated and assayed for the IFN- γ inducing activity and the protein content, revealing that this purification procedure yielded a purified polypeptide with a purity of 95 w/w % or higher in a yield of about 100%.

Example 5

Detection of polypeptide on enzyme immunoassay

Rabbits were in usual manner immunized with a purified polypeptide obtained by the method in Example 1-2, and collected their blood. Immunoglobulin G antibody was isolated from the blood, and dissolved in PBS to give a concentration of 20 μ g/ml, and the solution was distributed into 96-well microplates in an amount of 100 μ l/well. The microplates were incubated at ambient temperature for 3 hours, followed by removing solutions containing IgG from the microplates, adding PBS containing one w/v % calf serum albumin to the microplates in an amount of 200 μ l/well, and allowing them to stand at 4°C overnight.

Phosphate buffered saline was removed from the microplates which were then washed with PBS containing 0.05 v/v % tween 20, and injected with 100 μ l/well of a solution prepared by appropriately diluting a purified polypeptide, obtained by the method in Example 1-2, with PBS containing 0.5 w/v % calf serum albumin, followed by reacting the mixture solution at ambient temperature for 2 hours under shaking conditions. The microplates were washed with PBS containing 0.05 v/v % tween 20, and injected with 100 μ l/well of a solution containing a monoclonal antibody H-1mAb labelled with biotin, followed by reacting the mixture

solution at ambient temperature for 2 hours under shaking conditions, washing the microplates with PBS containing 0.05 v/v % tween 20, injecting with 100 μ l/well of a solution containing a complex of horseradish peroxidase and streptoavidin, and further reacting the resultant mixture at ambient temperature for 2 hours under shaking conditions. Then, the microplates were washed with PBS containing 0.05 v/v % tween 20, and the activity of the horseradish peroxidase linked to the purified polypeptide was measured for absorbance at a wavelength of 492 nm using o-phenylenediamine as a substrate. The results were in Table 1.

Table 1

Concentration of polypeptide (pg/ml)	Absorbance at 492 nm*	Relative error (%)
1,000	1.51 \pm 0.05	3.3
500	0.93 \pm 0.05	5.4
250	0.55 \pm 0.03	5.5
100	0.25 \pm 0.02	8.0
50	0.137 \pm 0.007	5.1
25	0.080 \pm 0.007	8.8
0	0.024 \pm 0.007	-

Note : The symbol "*" means a statistical value of triplet.

As is evident from the results in Table 1, the detection method according to the present invention accurately assays the polypeptide in the range of about 50-1,000 pg/ml.

Example 6

Detection of polypeptide on radioimmunoassay

Rabbits were in usual manner immunized with a purified polypeptide obtained by the method in Example 1-2, and collected their blood, followed by isolating IgG antibody. The antibody was in usual manner adsorbed on polystyrene beads for radioimmunoassay, and allowed to stand in PBS containing 2 w/v % calf serum albumin at 4°C overnight to obtain an immobilized antibody.

One bead was placed in a test tube, soaked in 0.2 ml of a solution prepared by diluting a purified polypeptide, obtained by the method in Example 1-2, with PBS containing 0.5 w/v % calf serum albumin, and allowed to stand at 4°C for 4 hours. Then, the bead was washed with PBS containing 0.05 v/v % tween 20 and 0.5 w/v % calf serum albumin, soaked in 0.2 ml (1×10^5 cpm) of a solution containing a monoclonal antibody H-2mAb, obtained by the method in Example 3-2 and labelled with ^{125}I , and allowed to stand at 4°C overnight. After removing an excessive amount of ^{125}I -labelled antibody, the bead was washed with PBS containing 0.05 v/v % tween 20 and 0.5 w/v % calf serum albumin, followed by counting the radioactivity of the bead on a gamma-counter. The results were in Table 2.

Table 2

Concentration of polypeptide (pg/ml)	Count* (cpm)	Relative error (%)
1,000.0	6,900±200	2.9
500.0	4,100±20	0.5
250.0	2,390±50	2.1
125.0	1,590±70	4.4
62.5	880±10	1.1

0

700±20

-

Note : The symbol "*" means a statistical value of triplet.

As is evident from the results in Table 2, the present detection method accurately assays the polypeptide in the range of about 100-1,000 pg/ml.

[Effect of the Invention]

As is described above, the present monoclonal antibody specifically reacts with a polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. Therefore, the monoclonal antibody is widely used in the purification and detection of the polypeptide, and is prepared in a desired amount by a preparation using hybridomas.

The present invention with these significant functions and effects is a significant invention which greatly contributes to this field.

SEQUENCE LISTING

(1) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 157 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
		35					40					45			
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
	50					55				60					
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Xaa	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
				85					90					95	

Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
			100					105					110			
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
		115					120					125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
	130					135					140					
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
145					150					155						

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 471 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) strandedness: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: human

(B) INDIVIDUAL ISOLATE: liver

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat peptide

(B) LOCATION: 1..471

(C) IDENTIFICATION METHOD: S

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

TAC	TTT	GGC	AAG	CTT	GAA	TCT	AAA	TTA	TCA	GTC	ATA	AGA	AAT	TTG	AAT	48
Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1			5					10					15			
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	ATT	GAC	CAA	GGA	AAT	CGG	CCT	CTA	TTT	GAA	GAT	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
		20					25					30				
ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TGT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
	35				40						45					
ATA	AGT	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	GCT	GTA	ACT	ATC	192
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
	50			55			60									
TCT	GTG	AAG	TGT	GAG	AAA	ATT	TCA	AYT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Xaa	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile	
65			70				75				80					
ATT	TCC	TTT	AAG	GAA	ATG	AAT	CCT	CCT	GAT	AAC	ATC	AAG	GAT	ACA	AAA	288
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
			85				90				95					
AGT	GAC	ATC	ATA	TTC	TTT	CAG	AGA	AGT	GTC	CCA	GCA	CAT	GAT	AAT	AAG	336
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
		100					105				110					
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TGT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
		115					120					125				
AAA	GAG	AGA	GAC	CTT	TTT	AAA	CTC	ATT	TTG	AAA	AAA	GAG	GAT	GAA	TTG	432
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
	130					135					140					
GGG	GAT	AGA	TCT	ATA	ATG	TTC	ACT	GTT	CAA	AAC	GAA	GAC				471
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
145					150					155						

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH:11

(B) TYPE:amino acid

(D) TOPOLOGY:linear

(ii) MOLECULE TYPE:peptide

(v) FRAGMENT TYPE:N-terminal fragment

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:3:

Met Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser
1 5 10

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH:25

(B) TYPE:amino acid

(D) TOPOLOGY:linear

(ii) MOLECULE TYPE:peptide

(v) FRAGMENT TYPE:internal fragment

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:4:

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile
1 5 10 15
Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys
20 25

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH:18

(B) TYPE:amino acid

(D) TOPOLOGY:linear

(ii) MOLECULE TYPE:peptide

(v) FRAGMENT TYPE:internal fragment

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:4:

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu
1 5 10 15
Pro Gln

(6) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH:471 base pairs

(B) TYPE:nucleic acid

(C) strandedness:double

(D) TOPOLOGY:linear

(ii) MOLECULE TYPE:cDNA to mRNA

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM:mouse

(B) INDIVIDUAL ISOLATE:liver

(ix)FEATURE:

(A)NAME/KEY:mat peptide

(B)LOCATION:1..471

(C)IDENTIFICATION METHOD:S

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:6:

AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	CAC	TGT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	48
Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	
1				5					10					15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	GTT	GAC	AAA	AGA	CAG	CCT	GTG	TTC	GAG	GAT	ATG	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	
			20					25					30			
ACT	GAT	ATT	GAT	CAA	AGT	GCC	AGT	GAA	CCC	CAG	ACC	AGA	CTG	ATA	ATA	144
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile	
		35					40					45				
TAC	ATG	TAC	AAA	GAC	AGT	GAA	GTA	AGA	GGA	CTG	GCT	GTG	ACC	CTC	TCT	192
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	
	50					55				60						
GTG	AAG	GAT	AGT	AAA	AYG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Xaa	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
65				70						75				80		
TCC	TTT	GAG	GAA	ATG	GAT	CCA	CCT	GAA	AAT	ATT	GAT	GAT	ATA	CAA	AGT	288
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	
				85					90					95		
GAT	CTC	ATA	TTC	TTT	CAG	ATA	CGT	GTT	CCA	GGA	CAC	AAC	AAG	ATG	GAG	336
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	
			100					105					110			
TTT	GAA	TCT	TCA	CTG	TAT	GAA	GGA	CAC	TTT	CTT	GCT	TCC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	
	115					120						125				
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	CTC	ATT	CTG	AAA	AAA	AAG	GAT	GAA	AAT	GCG	GAT	432
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	
	130					135					140					
AAA	TCT	GTA	ATG	TTC	ACT	CTC	ACT	AAC	TTA	CAT	CAA	AGT				471
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser				
145					150					155						

[Brief Description of the Accompanying Drawings]

FIG. 1 is a figure of the structure of recombinant DNA pKGFHH2.

FIG. 2 is a figure of Western blotting which shows the reactivity of a purified polypeptide and human interleukin 12 with the present monoclonal antibody B-1mAb.

[Explanation of the Symbols]

KGFHH2 cDNA : cDNA encoding the present polypeptide

Ptac : tac promoter

rrnBT1T2 : terminator of ribosome RNA operon

AmpR : ampicillin resistant gene

ori : replication initiating site of *Escherichia coli*

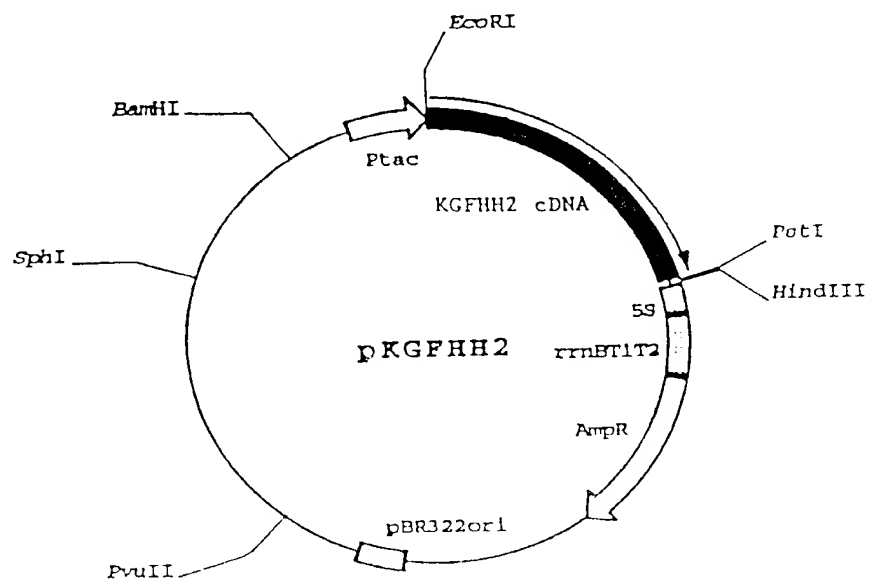


FIG.1

[Document Name] Abstract

[Summary]

[Object] The present invention provides a monoclonal antibody which is specific to a polypeptide that induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, a hybridoma capable of producing the monoclonal antibody, and uses thereof.

[Construction] The present invention is constructed by a monoclonal antibody which is specific to a polypeptide having a specific amino acid sequence, a hybridoma capable of producing the monoclonal antibody, a process for preparing the monoclonal antibody comprising culturing the hybridoma *in vivo*, i.e. in an animal, or *in vitro*, i.e. in a nutrient culture medium, and collecting the formed monoclonal antibody from the resultant culture or the body fluid, a purification method of the polypeptide comprising contacting the monoclonal antibody with a mixture solution containing the polypeptide and impurities, and desorbing the polypeptide adsorbed on the antibody, and a method for detecting the polypeptide by contacting the monoclonal antibody with a sample containing the polypeptide to immunologically react them.

[Selected Figure] None